

4.6 ESTUDIOS EXPERIMENTALES

Mariana Pueta^{1,2}, Fabián G. Jara³, Marcelo F. Bonino¹ & M. Gabriela Perotti¹

¹ *Laboratorio de Ecología, Biología Evolutiva y Comportamiento de Herpetozoos, INIBIOMA (CONICET—UNComa), Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente, Centro Regional Universitario Bariloche- Universidad Nacional del Comahue, San Carlos de Bariloche, Rio Negro, Argentina.*

² *Departamento de Biología General, (CRUB-UNComa), Centro Regional Universitario Bariloche-Universidad Nacional del Comahue, San Carlos de Bariloche, Rio Negro, Argentina.*

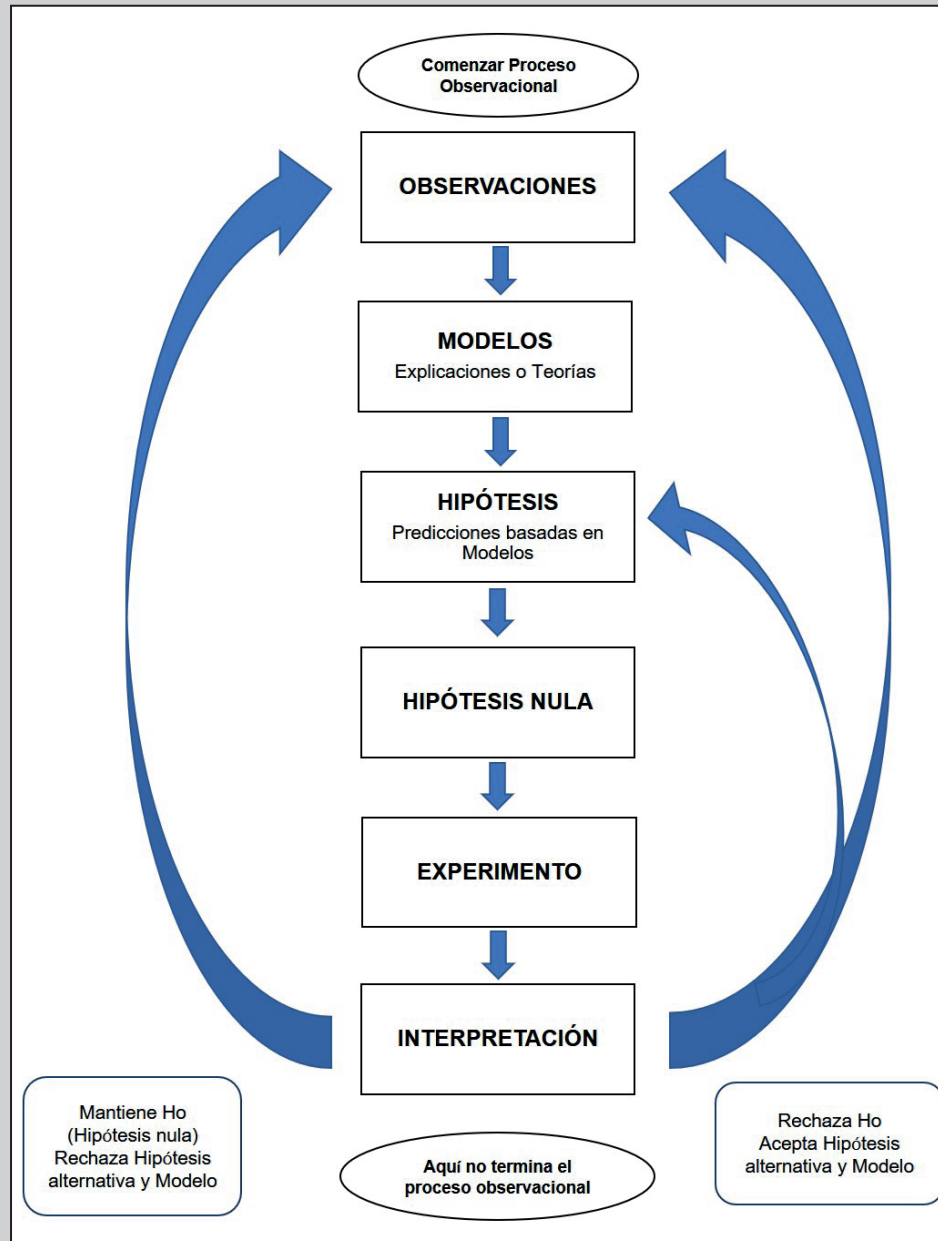
³ *Grupo de Ecología de Macroinvertebrados Acuáticos, INIBIOMA (CONICET—UNComa), Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente, Centro Regional Universitario Bariloche- Universidad Nacional del Comahue, San Carlos de Bariloche, Rio Negro, Argentina.*

Las investigaciones en biología y ecología comienzan con la observación de ciertos patrones o fenómenos que despiertan curiosidad. Estas observaciones pueden variar en escala, desde escalas muy grandes y extensas (paisaje) a escalas muy locales (una comunidad); también, pueden ser de largo o de corto plazo. Si los patrones observados se relacionan con procesos naturales reales, pueden constituir entonces modelos que explican un fenómeno biológico observado. Dicho fenómeno podrá ser validado a través de experimentos siguiendo un diseño experimental (**Caja 4.6.1**)^(1,2) (Ver también **Sección 2 Diseño de Muestreo** en este manual).

El diseño de experimentos rigurosos permite identificar relaciones causa y efecto y umbrales de respuesta mediante una cuidadosa manipulación de varios factores de interés, mientras se controlan otros factores que podrían confundir los resultados o la interpretación de los mismos^(3,4). En general, un experimento es un procedimiento utilizado para verificar, refutar o validar una o más hipótesis; normalmente, un experimento se puede ejecutar por uno o más de los siguientes motivos: (a) determinar las principales causas de variación en una variable respuesta medida, (b) identificar condiciones que dan lugar a una respuesta máxima o mínima, (c) comparar las respuestas obtenidas en diferentes escenarios de variables controlables, (d) obtener un modelo matemático/biológico para predecir respuestas futuras⁽⁵⁾.

En un contexto biológico, el término modelo a menudo se refiere a organismos o especies que sirven como una plataforma ampliamente utilizada para la investigación experimental. En anfibios, el enfoque experimental ha generado evidencias para una mejor comprensión de la fisiología, biología evolutiva, ecología y comportamiento de estos organismos. Además de su valor intrínseco como grupo de vertebrados, los anfibios se han destacado como modelo animal en la investigación biológica y biomédica, en áreas como la fisiología y la biología del desarrollo, principalmente. Un ejemplo de la importancia que han tenido los anfibios, como organismos empleados en el aporte de nuevo conocimiento a través de la experimentación biomédica, se observa a través de la contribución de varios premios Nobel en fisiología y medicina que han involucrado la experimentación con anfibios como animales de laboratorio, lo que ha aportado a innumerables tratamientos y terapias para humanos, así como grandes avances en la comprensión de los principios básicos de genética, fisiología, bioquímica y comportamiento animal⁽⁶⁾. También los anfibios son utilizados como modelo para abordar paradigmas fundamentales en ecología, por ejemplo, aspectos relacionados a competencia intra- e inter-específica, interacción depredador-presa, parasitismo, entre otros⁽⁷⁻¹⁰⁾. En las últimas décadas los anfibios han resultado ser modelos sumamente adecuados para el estudio de diferentes problemáticas tanto a

Caja 4.6.1 - Esquema generalizado de los componentes lógicos de un programa de investigación. Adaptado de Underwood⁽¹⁾



escala global como regional, como el estudio de estresores antropogénicos tales como la pérdida de hábitat, la contaminación ^(11,12), citando solo un par de ejemplos de Argentina), la introducción y/o translocación de especies que

pueden resultar invasoras (ejemplo en Argentina:¹³), las enfermedades emergentes (¹⁴; en Argentina¹⁵⁻¹⁷), y el cambio climático global⁽¹⁸⁻²³⁾. También los anfibios han constituido un modelo de estudio en enfoques de biología evolutiva del desarrollo (“Evo-Devo”)⁽²⁴⁾ con abundantes estudios en Argentina como, variación y diversificación morfológica (e.g.²⁵⁻²⁸), desarrollo músculo-esqueleto (e.g.²⁹).

La experimentación en biología debe incluir un diseño experimental adecuado y un uso apropiado de análisis estadísticos en un marco de prueba de hipótesis (^{30,31}; ver también **Sección 2, Diseño de Investigación** de este Manual). Por lo general, luego de formulada la pregunta o hipótesis a testear, en un experimento se debe poder identificar factores o variables independientes (tratamientos o condiciones) que se vinculan con las causas que queremos estudiar y variables respuesta o dependientes (características o rasgos a medir en los individuos experimentales) que se relacionan con los efectos a estudiar. En términos generales, la limitación más importante sobre una correcta interpretación del resultado de un experimento se debe a la dificultad de diferenciar el efecto de un tratamiento del efecto de otros factores no controlados en el diseño, lo cual puede conducir a una confusión de diferencias entre tratamientos. El experimento más simple consiste en variar una sola condición (la variable independiente) y medir una o más variables respuesta, mientras se mantienen constantes todas las demás condiciones⁽³¹⁾. Los efectos de variar la condición (efecto del tratamiento) se evalúan por comparar la/las variables respuesta medidas para un grupo de sujetos (o unidades experimentales) que suele denominarse grupo de tratamiento o grupo experimental, con otro grupo de individuos (o unidades experimentales) denominados grupo control^(3,31). El control es de suma importancia en todo experimento y es uno de los puntos más importantes del enfoque experimental^(3,30). Idealmente, los sujetos o unidades experimentales deben ser asignados aleatoriamente a los grupos experimentales y al control y tratados de manera idéntica, excepto con respecto a la variable independiente en estudio⁽³¹⁾. Diseños con muchos tratamientos o factores combinados deben usarse con cuidado, especialmente porque en los estudios biológicos la interacción entre efectos es común y además porque resulta complicado luego analizar las interacciones entre los factores. En el caso de trabajar con más de un tipo de variable independiente o tratamiento, el diseño experimental debe ser lo suficientemente adecuado para poder establecer causas principales y/o interacciones de dichos tratamientos sobre la variable respuesta. En este sentido al aumentar el número de tratamientos se incrementarán los grupos experimentales y con ello será necesario incrementar el número de réplicas para poder obtener conclusiones valederas.

La mayoría de los estudios experimentales en anfibios se han realizado con estados embrionarios o larvales ya que son más fáciles de mantener en condiciones experimentales que los juveniles o adultos, asimismo esto puede depender mucho de cada especie o de la pregunta o hipótesis que se formula^(32,33). Los experimentos pueden realizarse puertas adentro ya sea en un área experimental de laboratorio o en incubadoras o cámaras tipo “Walk-in” (espacios completos adecuados con condiciones que puedan ser controladas, como temperatura, fotoperíodo), o pueden realizarse al aire libre. Al aire libre, pueden realizarse en ámbitos más “naturales”, ya sea en tanques y/o recipientes en los exteriores de un predio o laboratorio o en clausuras (mesocosmo) colocadas directamente en los humedales en el caso de estadios embrionarios y larvarios (ver **Figura 4.6.1**), o sitios terrestres habitados por juveniles y adultos de las especies bajo estudio. Un mesocosmo es un sistema experimental (clausura) al aire libre que examina el entorno natural en condiciones en las que pueden controlarse ciertas variables y puede definirse como un recinto experimental de entre 1 a varios miles de litros de capacidad^(34,35). En el caso de larvas de anfibios es aconsejable contar con recipientes relativamente pequeños (de entre 1 a 5 litros de capacidad). Para experimentos simulando sistemas acuáticos lénticos, los mesocosmos son una herramienta fundamental, especialmente si los experimentos son de mediano o largo plazo ya que permiten generar condiciones ambientales intermedias entre experimentos en microcosmos más pequeños y la mayor complejidad biológica de los sistemas naturales, en los que suelen no poder identificarse las relaciones mecanicistas^(34,35). Recipientes más pequeños y sin la complejidad ambiental de un mesocosmo acuático se utilizan en experimentos a corto plazo o para la evaluación de ciertas preguntas puntuales de experimentos más complejos. La experimentación con juveniles o adultos de anfibios es más compleja dado los requerimientos de mantenimiento para asegurar el bienestar de los animales. En general se utilizan terrarios con vegetación natural, humedad constante o una fuente de agua y provisión de alimento⁽³⁶⁻⁴⁰⁾. En muchos casos estos experimentos complementan estudios a campo, son de corta duración y es una gran ventaja la cercanía del lugar experimental y los sitios de colecta^(37,40-42). Mesocosmos terrestres para mantener anfibios en estadios post-metamórficos, juveniles o adultos se suelen utilizar en experimentos relacionados con temáticas de disturbios ambientales de origen antrópico, como contaminantes^(20,34,43,44), y también cuando se plantean preguntas teóricas relativas a estudios morfológico-funcionales, fisiológicos, por nombrar solo algunas temáticas de estudio (e.g.⁴⁵).



Figura 4.6.1. Mesocosmos colocados en ambientes naturales (clausuras), en este caso empleados en estudios de interacciones tróficas que incluyen anfibios. Estas clausuras permiten el intercambio de agua con el exterior facilitando la alimentación de las larvas de anuros. Foto: F. Jara.

4.6.1 Métodos, técnicas y protocolos previos y durante los ensayos experimentales

i) Consideraciones y protocolos para minimizar exposición y transmisión de patógenos. Uso y desinfección del material que se emplea en el campo

El trabajo de campo con anfibios en cualquiera de los estadios de desarrollo de su ciclo de vida implica, en general, tener contacto, ingreso y manipulación con ambientes acuáticos de distinto tipo, tanto lóticos como lénticos. Por lo tanto, es necesario tener en cuenta una serie de consideraciones y recomendaciones. Se desarrollan brevemente, a modo de recordatorio, ciertas pautas de cuidado, ya que este apartado también está desarrollado en la **Sección 4.10 Registro de hongos. Protocolos en campo y laboratorio** de este Manual.

- **Consideraciones generales**

Es importante tener en cuenta que resulta conveniente tener conjuntos o grupos de elementos y equipo de muestreo menor (redes-bateas-baldes, etc.) que posibiliten su utilización, indefectiblemente, SOLO en la localidad de estudio SIN INTERCAMBIO entre otras localidades.

En el caso que el equipo sea reutilizable y que no pueda ser replicado para su uso individual en distintos sitios, ya sea por su costo o por su tamaño (botas-Waders-aparatos multiparamétricos del tipo de registro de oxígeno disuelto, pH, conductividad, etc.), es imprescindible que se siga un protocolo de

desinfección cada vez que se termina con la visita a un sitio de estudio, para evitar translocación de organismos (e.g.: algas) o transmisión y dispersión de hongos, bacterias u otros patógenos.

- **Elementos de desinfección y tratamiento del material de muestreo empleado**

A continuación, se presentan una serie de pautas de cuidado y desinfección de los elementos y el material de muestreo (**Tabla 4.6.1**; ampliada de la **Sección 4.10, Registro de hongos. Protocolos en campo y laboratorio**); dichas pautas constituyen tanto elaboración de los autores de esta Sección por experiencias propias, como recopilación de información de otras publicaciones⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾ y están enfocadas principalmente a minimizar la transmisión y dispersión de enfermedades presentes en especies de anuros de Argentina y la región como: quitridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*), ranavirus⁽¹⁵⁾, oomicetes^(16,17,49-53); y también considerando la dispersión de otros organismos considerados invasores, recientemente detectados, como el alga “Didymo” (*Didymosphenia geminata*), que ya está presente en diferentes cuerpos de agua de Argentina (e.g.: ambientes fluviales y lacustres a lo largo de la Patagonia Andina desde Neuquén a Tierra del Fuego)^(48,54).

De acuerdo a lo anteriormente presentado, resulta imperativo cumplir con dichas recomendaciones cuando se trabaja con anfibios, además constituye una responsabilidad promulgarlas en otros grupos de investigación cuyas tareas estén asociadas a muestreos y trabajo de campo en ambientes acuáticos lóticos o lénticos. A partir del trabajo conjunto con diferentes organismos nacionales, provinciales y municipales, se diseñó un protocolo que derivó en una resolución emitida por la Administración de Parques Nacionales, sobre la importancia de estas prácticas (Resolución Nro. 000774, 2010-**Apéndice 4.6.1**). También es importante tener en cuenta todas estas pautas cuando se trabaja entre áreas antropizadas y áreas prístinas. Por ejemplo, los ambientes acuáticos urbanos están muy impactados, muchos de los cuales reciben una gran variedad de sustancias químicas, bacterias, etc. que podrían ser transportadas a aquellos humedales más prístinos o ubicados en áreas protegidas o mejor conservadas.

ii) Consideraciones sobre registro de datos ambientales y colecta de material biológico (adultos, larvas y huevos) en ambientes naturales

- **Consideraciones generales**

Para el estudio de anfibios en un contexto en el que se va a trabajar siguiendo un diseño experimental es necesario tener claro como primer paso, cual es la pregunta, objetivo o hipótesis a estudiar. Asumiendo que la pregunta está

PROPÓSITO	DESINFECTANTE	CONCENTRACIÓN	TIEMPO	PATÓGENO
Desinfección equipo tipo quirúrgico (pinzas, tijeras, etc.)	Etanol	70%	1 minuto	Quitridio Ranavirus
	Agua caliente	100 °C	10 minutos	Oomycetes (<i>Saprolegnia</i> , <i>Achlya</i> , <i>Scoliolegnia</i>)
Desinfección equipo de colecta y recipientes de colecta	Hipoclorito de Sodio (Lavandina de uso doméstico)	4%	15 minutos	Quitridio Ranavirus
		2%	mínimo 1 minuto	<i>Didymo</i>
	Secar completamente		3 horas o más	Quitridio
	Calor	60 °C	5 minutos	Quitridio
			15 minutos	Ranavirus
			20 minutos	<i>Didymo</i>
		37 °C	4 horas	Quitridio
	Esterilización con RUv		1 minuto	Ranavirus (solamente)
	Enjuague con agua hervida	100 °C	varios enjuagues	Oomycetes (<i>Saprolegnia</i> , <i>Achlya</i> , <i>Scoliolegnia</i>)
Desinfección de botas/wader	Hipoclorito de Sodio (Lavandina de uso doméstico)	4%	15 minutos	Quitridio <i>Didymo</i> Oomycetes (<i>Saprolegnia</i> , <i>Achlya</i> , <i>Scoliolegnia</i>)
		2%	por lo menos 1 minuto	<i>Didymo</i>
	Secar completamente		3 horas o más	Quitridio <i>Didymo</i>
Desinfección de telas o prendas usadas en el campo	Agua caliente	60 °C o más	5 minutos	Quitridio
			1 minuto	<i>Didymo</i>
			15 minutos	Ranavirus
			varios enjuagues	Oomycetes (<i>Saprolegnia</i> , <i>Achlya</i> , <i>Scoliolegnia</i>)

Tabla 4.6.1. Métodos de desinfección de material de campo cuando se trabaja en ambientes acuáticos (las especies de Oomycetes que se citan infectan anfibios con distribución en Argentina^(16,83); alga invasora *Didymo*⁴⁸).

formulada, el paso siguiente requiere revisar la metodología completa de colecta que se va a emplear, esto incluye considerar la solicitud de permisos de trabajo teniendo en cuenta todas las jurisdicciones que correspondan (Nacional, Provincial, Municipal, ver **Sección 5**) y realizar un listado, revisión y chequeo de todo el equipo necesario para el trabajo que se realice en la naturaleza.

Una vez establecido todo el material y equipo necesario para el estudio, se debe chequear todo aquel que requiera calibración, baterías, uso de memo-

ria, actualización de software u otro requerimiento particular (aireadores, heladeras portátiles con conexión a baterías, linternas, pH-metros, oxímetro, termómetros digitales, cámaras fotográficas, notebooks, teléfonos celulares, dataloggers, uso de lápiz para evitar que las anotaciones no se borren con el contacto con el agua, es recomendable también usar papel que pueda mojarse y no romperse como papel de tela, etc.).

Algo importante a tener en cuenta en relación a los organismos que se van a colectar es la posibilidad de exposiciones previas de dichos organismos con ciertos estímulos que puedan influir de manera no controlada en los experimentos. A los organismos que no han sido expuestos a ciertos factores de interés suele denominárselos individuos “naïve” o “no expuestos”. Un ejemplo típico está relacionado con la capacidad de los embriones de detectar estímulos químicos desde estadios muy tempranos del desarrollo⁽⁵⁵⁾. Entonces, en un experimento que, por ejemplo, estudia el efecto de claves químicas de depredadores sobre el comportamiento y morfología de renacuajos, la opción más adecuada es llevar anfibios adultos al laboratorio (machos y hembras reproductivos) y estimular su reproducción en el laboratorio para la obtención de huevos fecundados. Sin embargo, esto a veces puede resultar logísticamente complicado, por lo que una opción muy utilizada también es colectar embriones en estadios tempranos (gástrula), para asegurar que los individuos a utilizar en el experimento no han tenido experiencia previa con dichas claves químicas, no han llegado a “oler” estímulos del depredador. De esta forma, al finalizar el experimento y comparar grupo experimental y grupo control, los resultados podrán asociarse al tratamiento aplicado y podrán descartarse los efectos de exposición previa. También en larvas de anfibios como en adultos podemos colectar organismos no expuestos a un factor a estudiar. Por ejemplo, si se quiere estudiar el efecto de una especie exótica sobre larvas o adultos de anfibios, bastará con colectar individuos de sitios donde se conozca que históricamente no habita dicha especie exótica^(56,57).

- **Localización y colecta de muestras**

1) *Huevos/masas de huevos*. El conocimiento detallado, si es posible, del modo reproductivo de la/las especies a estudiar facilitará el diseño de muestreo de huevos o masas de huevos en el campo, tanto para ensayos que se realicen en el laboratorio como en el campo. Esto es, conocer uno o mas aspectos como, el periodo del año en que se desarrolla la actividad reproductiva, los sitios o microhábitats que eligen para la oviposición las especies, las características de los huevos y el tipo de ovipostura (**Figura 4.6.2**), la tasa y duración del desarrollo, estadio y tamaño a la eclosión, y tipo de cuidado parental si lo hay (ver **Sección 3.1 Relevamiento de oviposturas y embriones** de este Ma-

nual para más detalles). En caso de ensayos experimentales en el laboratorio, las masas de huevos pueden ser trasladadas en bolsas tipo “Ziploc”® o en botellones plásticos.

2) *Larvas*. Las larvas pueden hallarse en diferentes tipos de hábitats, desde cuerpos de agua someros, lagunas más profundas, arroyos, ríos y todos ellos también podrán variar en su complejidad; por ejemplo, fondos con rocas, troncos, o vegetación densa. Esta diversidad de ambientes y su complejidad hace que, al momento de monitorear y colectar las larvas de anfibios deban emplearse diferentes técnicas; por ejemplo, el uso de redes permite barridos de la columna de agua en cuerpos de agua someros y perímetros de lagunas más profundas con poca vegetación. El uso de trampas embudo (**Figura 4.6.3A, B**) resulta efectivo en hábitats profundos o con cierta complejidad (presencia de piedras o rocas, troncos, o en el caso de presentar vegetación muy densa, cuando es difícil el uso de redes), y el empleo de cercos que suele ser efectivo para lagunas de gran superficie y cierta profundidad (**Figura 4.6.3C**; ver **Sección 3.2 Relevamiento de renacuajos** de este Manual para más detalles).



Figura 4.6.2. Tipos de ovipostura. **A.** *Pleurodema thaul*- cordones gelatinosos adheridos a vegetación de la columna de agua; **B.** *Pleurodema bufoninum*- cordones gelatinosos dispersos entre vegetación de fondo de humedales someros; **C.** *Rhinella papillosa*- cordones gelatinosos dispersos en el fondo de humedales rocosos; **D.** *Batrachyla* sp.- huevos individuales ubicados en “nidos” entre la vegetación húmeda. Foto A: F. G. Jara; Fotos B, C y D: M. G. Perotti.



Figura 4.6.3. Empleo de trampas y cercos en lagunas rocosas y profundas en Laguna Blanca, Neuquén. **A** y **B**: Trampas embudo para captura de renacuajos. **C**: Clausura con redes en laguna profunda⁽⁸³⁾. Fotos **A** y **B**: M. G. Perotti; Foto **C**: S. Ortubay, tomada de⁸⁴

Es importante, de existir conocimiento previo, tener en cuenta los comportamientos de las larvas de la/s especies de estudio ya que pueden ser relevantes al momento de su colecta o muestreo en los hábitats naturales. Por ejemplo, debemos considerar si tienen hábitos diurnos o nocturnos, si se movilizan de manera solitaria o gregaria, y que tipo de micro-ambientes frecuentan. En nuestra experiencia el uso de ciertos elementos resulta muy adecuado para el traslado de larvas al laboratorio, como el uso de botellones/recipien-

tes plásticos, con tapa, con aireación mediante aireadores transportables y teniendo en cuenta que dichos recipientes deben estar completos de agua para evitar movimientos bruscos dentro de la botella/recipiente durante el traslado.

3) *Adultos*. La inspección de potenciales sitios de reproducción de anfibios requiere de una serie de visitas. Para aquellas especies con hábitos diurnos, resulta más sencilla su detección, colecta y realización de ensayos tanto en el campo, como en el laboratorio. Sin embargo, en su gran mayoría, los anfibios presentan hábitos y actividad nocturna, hecho que puede dificultar su detección (ver **Sección 3.3 Relevamiento de postmetamórficos** de este Manual para más detalles). Dependiendo del sitio a muestrear, la visita nocturna debe ser bien planificada pues puede resultar desaconsejada por factores externos al estudio biológico en sí mismo (por ejemplo, en zonas urbanas donde la seguridad es un aspecto que hay considerar). Por lo que una alternativa puede ser la localización de huevos o masas de huevos, como un método indirecto adecuado de detección de actividad de adultos. Lo más recomendable es trasladar los adultos en cajas plásticas con aireación y papel o algodón humedecido.

iii) Consideraciones para el montado y elementos para su ejecución en el campo y en condiciones controladas en el laboratorio.

Antes de iniciar cualquier experimento se necesita definir claramente el objetivo o pregunta de manera de definir exactamente como se realizará el diseño experimental. Esto permitirá calcular, por ejemplo, la cantidad mínima necesaria de unidades experimentales para poder obtener resultados confiables (ver **Sección 2 Diseño de Muestreo**).

Por lo tanto, en esta sección el objetivo es describir en detalle aspectos prácticos a la hora de montar un experimento o ensayo experimental, tratando de aportar información útil y práctica, particularmente cuando los recursos de tiempo, de espacio o de equipamiento puedan resultar escasos. Estas recomendaciones permitirán llevar adelante los estudios propuestos, basados en una pregunta específica (hipótesis) y utilizando un diseño experimental apropiado.

1) Adecuación y mantenimiento de los organismos

1.1. *Huevos*. En general, la extracción en la naturaleza de huevos o masas de huevos involucra ciertos cuidados en su transporte al laboratorio. Es muy importante tener en cuenta que las oviposuras o conjunto de huevos/em-

briones deben sufrir la menor alteración posible durante su manipulación y transporte, ya que los movimientos bruscos, impactos mecánicos sobre los huevos, hipoxia, pueden ocasionar mortandad y además pueden interferir en el tiempo de desarrollo⁽⁵⁸⁾. También el incremento drástico de la temperatura de los huevos durante el traslado de los mismos puede generar altas tasas de mortalidad por lo que trasladar los mismos en recipientes refrigerados es la mejor opción.

Para su mantenimiento en el laboratorio, previo al montado de los ensayos experimentales, las bateas o piletas de gran capacidad (500 L) resultan adecuadas, ya que posibilitan suficiente espacio. Se debe tener en cuenta la ubicación de las mismas, evitando áreas donde reciban sol directo que pueda generar un rápido incremento de la temperatura. También, es importante que el agua sea de clorinada como se explica más adelante (ver en **“Acondicionamiento de las unidades experimentales”**). Cuando se encuentran en el exterior es importante considerar cubrir con tul o malla mosquitera las piletas de mantenimiento y cría, para que de esta manera se evite el ingreso de aves o insectos depredadores y al mismo tiempo permita el ingreso de la luz solar que es muy importante para el desarrollo de huevos y larvas. El agua de estos contenedores con huevos debe ser monitoreada regularmente, así como el estado de los huevos y considerar que, si hay evaporación, deberá reponerse la cantidad evaporada.

El empleo de recipientes como vasos y capsulas de Petri (**Figura 4.6.4A**) suelen ser útiles en el montado de unidades experimentales (réplicas) cuando se trabaja con huevos/embriones de anuros, donde se puede ubicar un número establecido de los mismos, que dependerá de la pregunta y el diseño experimental. Muchas veces, el material de vidrio específico de laboratorio (vasos de precipitado) es costoso, por lo que puede ser reemplazado por otros recipientes, por ejemplo, porta-velas de vidrio (**Figura 4.6.4B**) o vasos de plástico (recipientes plásticos, en general de 500 ml o de menor capacidad; **Figura 4.6.4C**), aunque es recomendable el uso de vidrio para evitar descartar plásticos al final de los ensayos y como hábito de cuidado del ambiente.

En casos particulares como la determinación del número de huevos en la ovipostura, existen herramientas y métodos sencillos:

a. Detección y conteo de oviposturas. Hay especies que resultan más sencillas de estudiar como las que suelen ubicar sus huevos en cordones o masas gelatinosas en las orillas de humedales y lagunas, ya sea libres o adheridas a la vegetación sumergida, ya que son fácilmente detectables a simple vista. Otras especies ubican las oviposturas debajo de troncos, en cavidades de troncos o suspendidas o formando nidos sobre vegetación (**Figura 4.6.2D**).

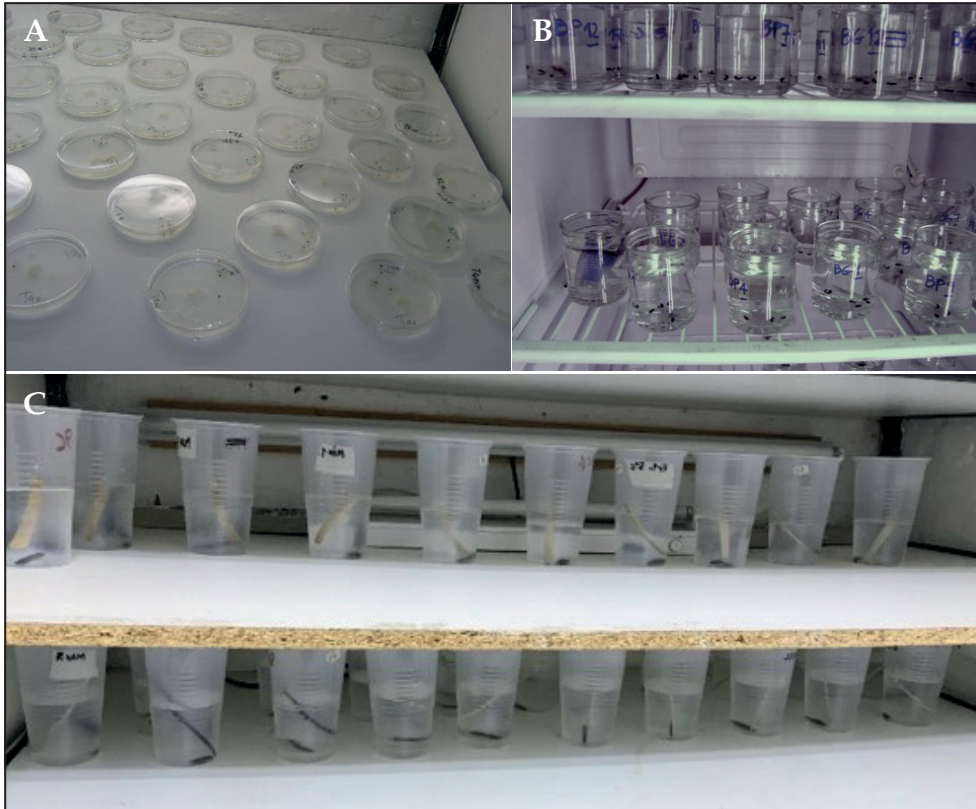


Figura 4.6.4. A. Uso de Cápsulas de Petri; B. Uso de porta-velas de vidrio; C. Vasos plásticos. Fotos: M. G. Perotti.

En todos los casos es conveniente recorrer los ambientes, el perímetro completo del sitio de estudio en el caso de lagunas someras, marcar las oviposturas con algún tipo de identificación (plástico, tela), de manera de identificar y realizar conteos precisos a lo largo de sucesivos muestreos o visitas.

b. Conteo de huevos. Respecto al conteo de huevos en ambientes naturales y en el laboratorio en especies con diferentes modos reproductivos, se recomiendan a continuación una serie de métodos posibles a realizar en el campo (conteo a simple vista) y otros combinando otras herramientas en el laboratorio, como análisis de fotografías, uso de lupa, etc., dependiendo del modo reproductivo

c. Conteo de huevos a simple vista (“ojo desnudo”) en el campo. Un método simple es el empleo de bateas blancas graduadas o cuadriculadas que puedan estar inmersas en la columna de agua, de manera de alterar lo menos posible a la masa de huevos (**Figura 4.6.5**, panel superior). De esta manera, el fondo blanco permite mejor visibilidad y distinción de los huevos como unidades para su conteo; así mismo la graduación facilita también el conteo. Por otro lado, se debe considerar, en caso que se desee optimizar el tiempo de trabajo de campo, realizar fotografías de dichas oviposturas en las bateas para su posterior conteo en el laboratorio. En algunos casos las oviposturas

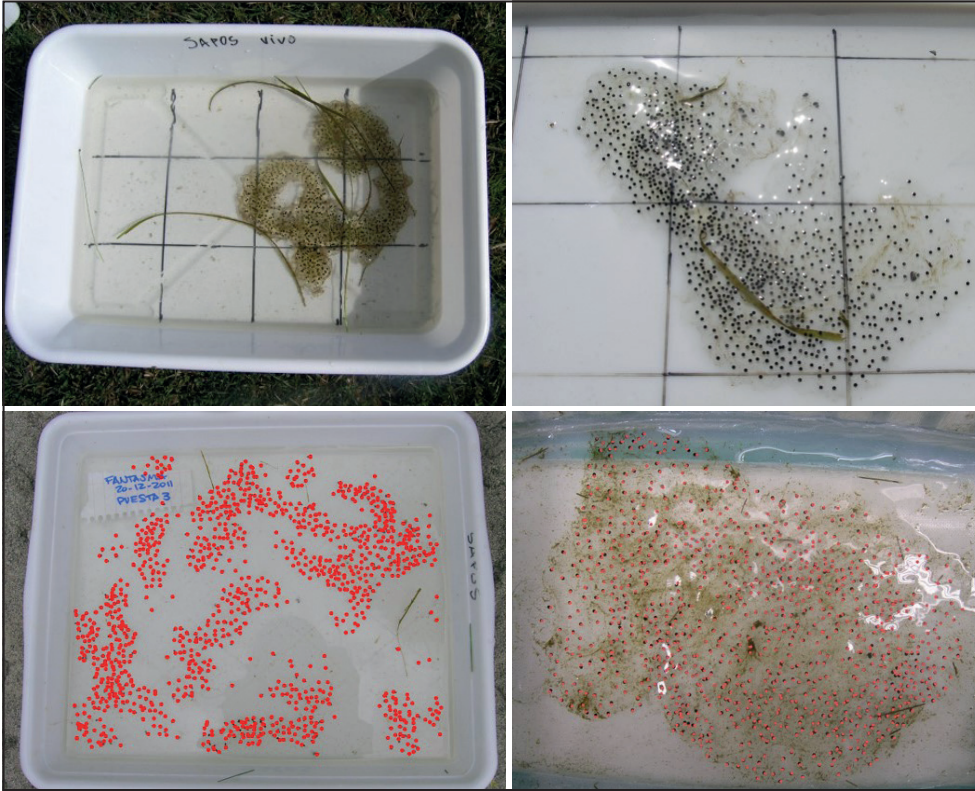


Figura 4.6.5. Panel superior, recipientes graduados. Panel inferior, marcas por conteo a través de software ImageJ. Fotos: M. G. Perotti.

son terrestres y estas se sitúan en el suelo húmedo del bosque que circunda los humedales (**Figura 4.6.6A**). Este es el caso de algunas especies del género *Batrachyla* (e.g. *B. taeniata* y *B. leptopus*⁵⁹) en este caso los huevos son puestos a fines del verano sobre el suelo, o bien semienterrados y cubiertos por detritus orgánicos (**Figura 4.6.6B**). Para contar el tamaño de puesta en estos casos es necesario recurrir a pinceles pequeños para ir removiendo de a poco la capa de sedimento y así ir colectando con una espátula o cuchara todos los huevos que componen la puesta.

d. Conteo de huevos en el laboratorio: los huevos de anfibios pueden contarse a “ojo desnudo”, o como se señaló anteriormente, a través de fotografías realizadas en el sitio de estudio. En el caso del conteo de huevos mediante fotografías deben considerarse ciertas pautas: debe procurarse una fotografía en la que la mayor parte de la imagen se encuentre en foco (para ello una toma cenital es lo recomendado), una iluminación adecuada, homogénea, evitando sombras. En la medida de lo posible, si la cámara lo permite, utilizar modalidad manual, tomando nota de la distancia focal, sensibilidad ISO y velocidad de obturación. Lo ideal es unificar las condiciones lumínicas y parámetros para todas las fotografías.



Figura 4.6.6. Ejemplo de especies que colocan sus huevos en tierra. **A.** zonas secas aledañas al humedal donde *Batrachyla taeniata* y *B. leptopus* depositan los huevos; **B.** huevos de *B. taeniata* semienterrados por detritus. Fotos: F. G. Jara.

Para el procesamiento de datos, en este caso el conteo de huevos de una fotografía, una herramienta muy versátil y muy usada es el software libre “ImageJ” (<https://imagej.nih.gov/ij/>; **Figura 4.6.5** panel inferior).

1.2. *Larvas*. Basados en nuestra experiencia y la de otros investigadores (e.g.:⁶⁰, <https://www.ieu.uzh.ch/en/research/ecology/change/labprotocols.html>), las larvas no se mantienen saludables cuando se crían y mantienen por tiempo prolongado dentro del laboratorio, con luz artificial y en recipientes de menos de 1 L de capacidad. Contrariamente y en general, se mantienen en buenas condiciones si son criadas en piletas o contenedores en el exterior del laboratorio, cuidando la ubicación de las piletas, las condiciones del agua, la incidencia de luz y la protección por ingreso de depredadores u otros organismos. Cuando el experimento requiere el empleo de recipientes pequeños que típicamente se usan dentro del laboratorio o la cámara incubadora, como alternativa estos recipientes pueden ubicarse en un recinto al aire libre (e.g.: Gazebo) que permite ciertas variaciones ambientales naturales en luz y temperatura y dónde puede llevarse a cabo el experimento (**Figura 4.6.7**).

Para el mantenimiento de las larvas, se debe establecer un protocolo sistematizado de alimentación, que dependerá del tipo de pregunta formulada para el experimento o ensayo, y de la especie y de la velocidad con la que se pretende que las larvas crezcan. Si el recipiente de mantenimiento lo permite, es importante evaluar la velocidad a que las larvas dejan de tener comida disponible para reponerla. Si los recipientes son muy chicos se recomienda extraer el excedente del alimento y renovar el agua frecuentemente para evitar que el agua pierda sus cualidades. Recomendamos como alimento una mezcla de algas/fitoplancton y proteína brindada por comida para peces, para lo cual, utilizamos uno o dos tipos de microalgas de fácil cultivo (e.g., *Scenedesmus* sp., *Chlamydomonas* sp., entre otras), en combinación con comida para peces de agua dulce (VitaFish®)⁶¹. En el caso de mesocosmos con mucho sustrato y fitoplancton dicha mezcla puede administrarse como suplemen-



Figura 4.6.7. Carpa gazebo ubicada en el jardín del laboratorio. Foto: M. Pueta.

taria ya que permite asegurar la presencia de suplemento proteico. Asimismo, los recipientes pequeños pueden necesitar de limpieza diaria del fondo con un “limpiafondo” que puede realizarse con una manguera pequeña (como las típicas mangueras empleadas con aireadores en peceras). Cabe destacar que si los renacuajos son carnívoros habrá que reemplazar el alimento vegetal por invertebrados acuáticos o bien larvas de otros anuros de los cuales se alimenta.

El uso de pipetas automáticas o micropipetas de hasta 1000 μL (**Figura 4.6.8**) suele ser de mucha utilidad a la hora de establecer una alícuota similar para todos los sujetos experimentales. Dichas pipetas son muy útiles también para la manipulación de cualquier estímulo experimental de fase líquida, por ejemplo, claves químicas.

1.3. *Adultos.* Para el mantenimiento de juveniles o adultos de anfibios suelen utilizarse terrarios (acuarios) de vidrio o cajas plásticas. En todos los casos es deseable que los recintos estén ubicados en lugares con mínimo disturbio para ayudar a minimizar el estrés de los animales. Los recintos más simples y que suelen usarse en situaciones de mantenimiento a corto plazo, son recintos con un sustrato de toallas de papel con humedad constante y algún tipo de refugio^(38,39,41). Lo óptimo sería mantenerlos en un recinto con vegetación natural y cierta complejidad ambiental que incluya zonas con agua, refugios, rocas, etc.^(36,40,62). Los alimentos más utilizados son gusanos, moscas



Figura 4.6.8. Pipeta automática.
Foto: V. H. Meneses

de la fruta (*Drosophila* sp.) o pequeños grillos⁽³⁶⁻⁴⁰⁾. La densidad de animales por recinto no solo dependerá del tamaño del mismo sino también del objetivo de estudio y de las interacciones sociales que entre ellos puedan suceder (e.g.: intercambio de estímulos químicos, agresión)^(41,62). Si el mantenimiento es en un lugar cerrado debe sistematizarse y controlarse el ciclo de luz-oscuridad y la temperatura adecuada según la época del año y/o el objetivo del estudio. En el caso de experimentos en mesocosmos terrestres, estos recintos suelen también ser los de mantenimiento y suelen estar contruidos de plástico, o de tela plástica y malla metálica o de aluminio. En muchos casos los mesocosmos para mantenimiento y experimentación con anfibios adultos se hacen utilizando sólo paredes artificiales y aprovechando el suelo natural, en esos casos se debe tener en cuenta la profundidad de dichas paredes para evitar que los anfibios escapen cavando, y en todos los casos es aconsejable algún tipo de cobertura semitransparente para que los anfibios no puedan escapar ni ser atacados por depredadores.

2) Montado de experimentos

En general, para montar un experimento se recomienda tener en cuenta la ubicación de las unidades experimentales (réplicas) tanto en exterior como

en interior (laboratorio), ya que se necesita controlar las variables que podrían, si no son controladas, producir resultados y conclusiones erróneas. Por ejemplo, estas variables podrán ser: la luz (diferencias en la exposición al sol y la sombra; diferencias en la intensidad de iluminación, en el caso de uso de estantes en un laboratorio o incubadora o cámara “Walk-In”), la inclinación del terreno, etc. Vamos a dar un ejemplo: supongamos un experimento en que buscamos determinar si el volumen de agua (experimentos conocidos como efectos del hidroperíodo) afecta atributos en las larvas de anfibios. Si nuestra metodología consiste en modificar el volumen de agua (modificar el hidroperíodo) en nuestras unidades experimentales, y las mismas se encuentran a la intemperie, éstas deberán estar alojadas debajo de un techo o invernadero para evitar que las precipitaciones alteren nuestros tratamientos y poder nosotros controlar la variación del hidroperíodo deseada en nuestro diseño experimental.

Cuando se trabaja con mesocosmos, en cámaras incubadoras o habitaciones adecuadas con control de variables como temperatura y luz (cámara Walk-In) con estanterías donde se ubicarán las réplicas del experimento, es conveniente planear el empleo de bloques aleatorios donde los tratamientos se distribuyan al azar en cada bloque (un bloque puede ser un estante en el laboratorio; un área en el terreno que contenga representados los distintos tratamientos; un contenedor o pileta compartimentada). Cada bloque entonces contendrá una réplica de cada tratamiento. Por ejemplo, en la **Figura 4.6.9** se muestra un esquema de una pileta donde se ha tabicado de manera de representar en dicha unidad (bloque) tres tratamientos. Podría ser un bloque donde cada compartimento representa un tipo de estímulo (1-químico, 2-visual, 3-sin estímulo) por parte de los depredadores empleando jaulas en los mesocosmos (ver a continuación ejemplo de estimulación visual y química de depredadores). De esta

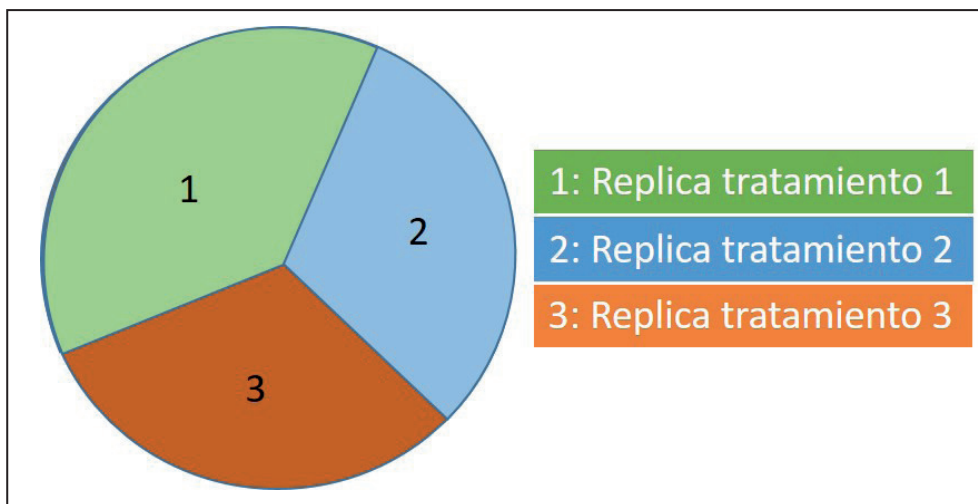


Figura 4.6.9. Ejemplo de Pileta compartimentada a modo de bloque.

manera, durante el procesamiento de datos, el análisis estadístico en bloques permitirá eliminar el sesgo (la confusión), si es que existe, por ejemplo, por la ubicación de las unidades experimentales en ambientes que no son totalmente homogéneos en sus condiciones (diferente exposición a la luz).

Muchas veces es necesario readecuar las incubadoras para permitir introducir aireadores que brinden oxígeno para los recipientes de trabajo y de esta manera controlar también esta variable (oxigenación de los recipientes) que podría introducir sesgo a los experimentos. Los recipientes de hasta un litro pueden adquirirse como insumos de vidrio para laboratorio o en cotillones en el caso de vasos plásticos de hasta un litro. Las piletas de mantenimiento o los mesocosmos de experimentación pueden ser de fibra de vidrio o lona similar a las piletas Pelopincho®, o bebederos para animales de granja. Los mesocosmos acuáticos medianos también se pueden armar a partir de recipientes plásticos fáciles de adquirir (palanganas; **Figura 4.6.10**).



Figura 4.6.10. Piletas de mantenimiento con marcos que permiten montar filtros o mallas y distintos tipos de mesocosmos acuáticos ubicados en el exterior del laboratorio. Fotos: M. G. Perotti, F. Jara.

Acondicionamiento de las unidades experimentales

-Previamente al armado de un experimento, todos los recipientes que vayan a emplearse tanto nuevos como reciclados, tendrán que ser lavados adecuadamente para retirar cualquier resto de alimento u olores que alteren el comportamiento de los animales experimentales, deben eliminarse los rótulos viejos, así como tener en cuenta el protocolo de desinfección explicado en el apartado anterior.

-Luego, los recipientes o mesocosmos deben ser llenados con agua en caso de trabajar con embriones y larvas, o poner una mínima cantidad de agua en caso de trabajar con adultos. En general se observan dos variantes en los trabajos publicados, una es directamente colocar agua declorinada (eliminando el cloro que pudiera contener, si es agua de red), que puede obtenerse teniendo recipientes de gran volumen donde se deje el agua el tiempo necesario para la evaporación por completo del hipoclorito de sodio (24-48 hs). La otra variante es con agua filtrada del humedal de donde provienen los animales experimentales. En el caso de trabajar con mesocosmos, la opción de utilización de agua filtrada del ambiente original facilita que los mesocosmos rápidamente desarrollen fitoplancton, facilitando la alimentación de los animales y permitiendo un ambiente con condiciones más similares al natural. Tanto en acuarios como en mesocosmos puede agregarse un fondo o sustrato, que puede ser hojarasca o sedimento de las lagunas, plantas acuáticas o bien plantas artificiales confeccionadas con plástico, etc. (**Figura 4.6.11**). No es recomendable el uso de agua filtrada del humedal en el caso de trabajar con estímulos químicos naturales, ya que el filtrado no elimina dichos estímulos. Por otro lado, cuando se introduzcan elementos provenientes del ambiente natural habrá que controlar que no contengan ninguna especie animal como caracoles, sanguijuelas, larvas o adultos de insectos depredadores, etc.

Los mesocosmos terrestres se construyen típicamente incluyendo el suelo natural en su instalación; sin embargo, las jaulas o tanques sobre el suelo también pueden usarse para manipulaciones terrestres con la adición de sustratos y condiciones ambientales apropiadas⁽³⁴⁾. Los mesocosmos terrestres pueden ser muy complejos y costosos ya que se debe proporcionar suficiente espacio para que los animales realicen actividades terrestres críticas como alimentarse, excavar e invernarse y al mismo tiempo permitir contar con suficientes réplicas^(34,44). Finalmente, en algunos casos, tanto en larvas de anfibios como en adultos es posible llevar a cabo diseños experimentales completos con preguntas sencillas directamente a campo, pero limitando las variables a controlar^(34,42,62-66).

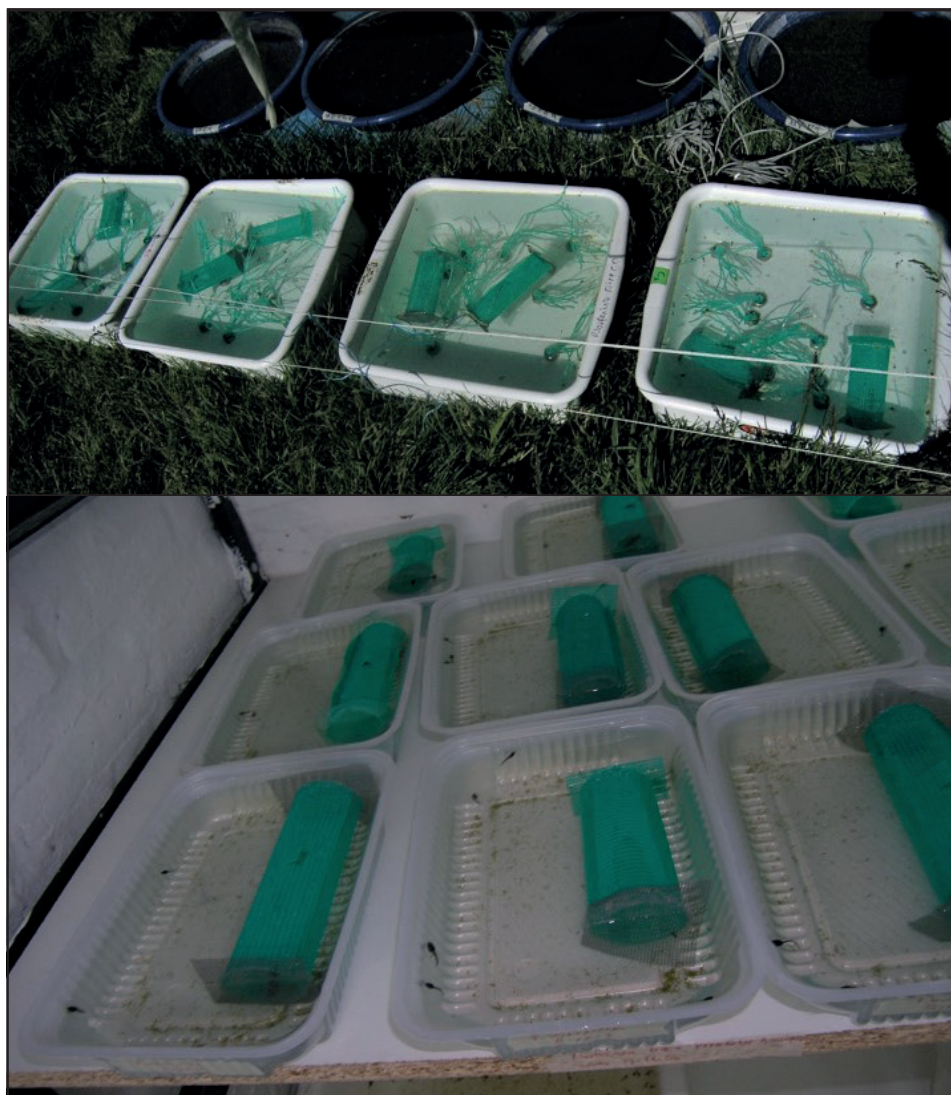


Figura 4.6.11. Diferentes elementos como jaulas plásticas o complejidad simulando vegetación. Foto: M. G. Perotti.

-Una vez que los recipientes o los mesocosmos están acondicionados podremos proceder a distribuir los tratamientos entre las unidades experimentales. Lo más adecuado es rotular colocando solo un código a cada unidad y de esta manera tendremos la mínima información a la hora de registrar los datos en cada réplica (doble ciego). Este tipo de metodología ayuda a disminuir sesgos introducidos por el observador⁽³¹⁾. Es importante que, en la planilla final, al lado de cada código de la unidad experimental, se coloque a qué tratamiento ha sido asignado, además de toda la información que sea necesaria posteriormente en el análisis de datos.

-Proceder a alojar a los animales experimentales. Es muy importante saber con cuántos animales experimentales se cuenta para poder asignar, por un lado, igual número de réplicas por tratamiento y por otro, igual cantidad de

individuos por réplica, (excepto que se pretenda medir efectos de la densidad de individuos). En el caso de experimentos de corto plazo realizados en recipientes de 1 L o menos, y cuando existen problemas en la cantidad de individuos disponibles para desarrollar el experimento, es preferible trabajar con uno o pocos individuos por recipiente y muchas réplicas, que trabajar con pocas réplicas y varios o muchos individuos por réplica. De esta manera, el mayor número de réplicas dará resultados más confiables. Es importante también tener en cuenta que, si se trabaja con varios individuos por réplica, deberá considerarse la variable a medir como un promedio de los individuos por réplica, ya que, si se consideran como datos individuales dentro de la misma réplica incurrirá en “pseudoreplicación”⁽⁶⁷⁾ (consultar también **Sección 2 Diseño de Muestreo**). Si la cantidad de individuos por réplica/mesocosmo supera los diez individuos, en general se recomienda hacer recuentos y asegurarse que el número de individuos sea igual en todas las réplicas.

Los individuos deben provenir de diferentes oviposturas (diferentes progenitores-camadas) de una población, para controlar el efecto genético/parental que podría llevar a errores o sesgos en la interpretación de los resultados. También si se quiere medir o controlar el efecto materno o de camada en el diseño, se debe tener en cuenta el origen (camada o masa original de huevos) de los individuos experimentales. En caso de querer medir efectos sobre diferentes poblaciones será necesario colectar oviposturas de estas diferentes poblaciones y mantenerlas separadas.

En el caso de cubrir las piletas o mesocosmos con tela semitransparente (tela o malla mosquitera) que impida la colonización por otros animales o la actividad de depredadores, se debe tener en cuenta que esta cobertura permita la observación por parte del experimentador.

Finalmente, como los anfibios presentan variaciones interanuales en la reproducción, es probable que la disponibilidad en la cantidad de huevos/embriones, larvas o adultos también varíe de un año a otro, por lo que siempre hay que tener en cuenta estas variaciones antes de llevar a cabo un experimento. Si se quiere simular la densidad en condiciones naturales, habrá que medir la densidad en la naturaleza para poder obtener una densidad por área o volumen y luego adaptar esa densidad a las réplicas.

Complejización ambiental en las réplicas/mesocosmos

Otra consideración importante es el uso de elementos o dispositivos experimentales dentro de los mesocosmos que sean necesarios para llevar a cabo adecuadamente el experimento. En todos los casos dichos elementos y su

distribución espacial deben ser similares en todas las réplicas, con la sola variación del efecto a evaluar. Por ejemplo, al evaluar efectos indirectos de los animales depredadores sobre las larvas de anfibios, es decir, cuando se quiere evaluar el efecto de estímulos que indican peligro ya sea químicos y/o visuales no debería verse afectada la supervivencia de las larvas por depredación directa. Para esto, el uso de jaulas para mantener al depredador es muy adecuado, por lo general se confeccionan en plástico, de manera sencilla, ya sea perforando botellas y cubriendo uno de sus extremos con tela mosquitera; o directamente construidas con malla plástica (**Figura 4.6.11**). En experimentos que incluyen el uso de jaulas, es necesario que todos los mesocosmos contengan al menos una (incluidos los controles). Este aspecto es muy importante para evitar resultados confusos como puede ser el efecto de presencia de un elemento diferente (jaula) en los mesocosmos. Un ejemplo práctico con el uso de jaulas sería que, los mesocosmos que correspondan al tratamiento que considere un efecto indirecto del depredador (químico y visual) contengan una jaula con un depredador vivo, mientras que los mesocosmos “control” contengan las jaulas vacías. Otro ejemplo de mayor complejidad experimental podría ser el caso de querer separar el efecto de estimulación visual del de estimulación química, entonces podrían asignarse mesocosmos con jaulas con depredador vivo, otros con jaulas con una imitación de depredador (confeccionado con material inocuo, e.g.: moscas de pesca) y mesocosmos “control” con jaulas vacías.

Consideraciones para estudios comportamentales

El desarrollo de experimentos que involucren la medición de una o más variables comportamentales requiere de ciertas consideraciones específicas que se suman a todas las consideraciones experimentales que se han explicado previamente. Un punto crítico al momento de desarrollar un experimento con registro de variables asociadas a rasgos de la conducta es que estas pueden ser moduladas a corto plazo por el ambiente circundante, los disturbios sensoriales, la subjetividad del observador, las experiencias previas de los animales, el bienestar de los animales en cautiverio, etc. Por lo tanto, las variables de disturbio introducidas por el ambiente experimental o el experimentador deben ser minimizadas o controladas.

Cuando una variable conductual sea registrada alternadamente por más de un observador, es necesario establecer un criterio conjunto para dicho registro; lo más apropiado es realizar correlaciones entre registros de los distintos observadores, lo que se denomina fiabilidad inter observador. Estas correlaciones son más fáciles de realizar cuando se cuenta con filmaciones

de los animales desde las cuales luego se evaluarán los comportamientos. Sin embargo, en experimentos donde no se puede filmar y las observaciones de comportamiento son por observación directa, se pueden realizar pruebas piloto previas a las experimentales y generar dicha fiabilidad. Lo ideal en el registro de conductas es filmar, de esta manera el disturbio generado por el experimentador es mínimo y, además, al quedar el registro fílmico, se pueden registrar varias variables desde una misma filmación que por observación directa podría ser muy complicado. Otra ventaja de filmar las evaluaciones de comportamientos, es poder hacerlo sobre más de una unidad experimental a la vez si el tamaño del recipiente de experimentación no es muy grande. Sin embargo, en mesocosmos acuáticos grandes, al aire libre y con complejidad ambiental puede ser más pertinente la observación directa que las filmaciones, ya que el reflejo en la superficie del agua es muy difícil de evitar en las filmaciones. Una recomendación útil al momento de hacer observaciones directas, tanto en mesocosmos montados directamente en sitios naturales como en zonas externas al laboratorio, es el uso de lentes polarizados, que por sus características de filtrado de la luz permiten ver más fácilmente a través de la columna de agua; además, a la hora de planificar el trabajo, tener en cuenta que los días ventosos dificultan la observación de comportamientos bajo el agua, haciendo casi imposible la observación debajo de la superficie del agua. En el análisis de videos, ya sea para análisis de trayectorias, velocidad de desempeño locomotor, entre otros, existen varios software libres, por ejemplo Tracker®, <https://physlets.org/tracker/> que se ha utilizado con éxito en estudios de desempeño⁽⁶⁸⁾. Para la toma de tiempos en ciertos comportamientos también se puede usar directamente un cronómetro digital mientras se reproducen los videos. Recomendamos el libro de Martin y Bateson⁽³¹⁾ como una guía básica de protocolos de observación y registro de comportamientos.

Los disturbios sensoriales deben ser tenidos en cuenta de acuerdo al estadio de los anfibios y la pregunta planteada. Por ejemplo, olores ambientales pueden ser de alto disturbio en el estudio con estímulos químicos entre adultos de anfibios. O, las vibraciones en terreno (el acercamiento brusco de un observador a un mesocosmo) pueden ser muy disruptivas para la evaluación de movimiento en renacuajos. Además, cuando las evaluaciones de comportamiento requieren que los animales sean trasladados de su lugar de mantenimiento al recinto experimental, se debe siempre prever un tiempo de adaptación al nuevo recinto. Para experimentos de comportamiento de corto plazo y especialmente si las evaluaciones de conducta se realizan sobre un individuo por vez, es recomendable trasladar a los individuos de su lugar de mantenimiento principal (e.g.: pileta) a nuevos recipientes que sean similares a los empleados en las evaluaciones y mantenerlos allí uno o dos días

previos al comienzo del experimento. Siempre que se pueda, es ideal que dichos recipientes de mantenimiento a corto plazo y los de evaluación sean de materiales y tamaños similares.

El tiempo o la hora del día en el cual se generan los registros conductuales es sumamente importante y debe mantenerse a lo largo de todo el experimento y en la replicación de experimentos similares para que sean comparables. Las condiciones de temperatura y fotoperiodo pueden ser controladas en el caso de trabajar dentro de un laboratorio o ser aleatoriamente distribuidas si se trabaja al aire libre. Igualmente, como mencionáramos antes, en el caso de alta heterogeneidad ambiental, es importante considerar el trabajo en bloques experimentales. Un caso especial a tener en cuenta es el estudio de rasgos asociados a comportamientos reproductivos en adultos de anfibios, como selección de vocalizaciones o discriminación de estímulos químicos; en general estos experimentos deben realizarse durante la noche mediante filmaciones con cámaras en modo nocturno^(37,40). En el caso de no poder realizar experimentos durante la noche, una alternativa para experiencias en laboratorio es revertir el ciclo de luz oscuridad para que el investigador pueda trabajar de día, pero se debe tener en cuenta el biorritmo y que los animales estén adecuados fisiológicamente al modo nocturno⁽³⁷⁾.

En el caso de estudios donde la variable respuesta implica orientación espacial de los anfibios, por ejemplo, en estudios de elección de estímulos, se debe tener en cuenta la lateralización motora o de procesamiento visual en anfibios, lo cual implica un sesgo innato en ciertos casos, o modulado por experiencias previas en otros, en cuanto a la orientación de las repuestas hacia “izquierda” o “derecha”⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾. La forma más común de controlar el sesgo de laterización es alternando la orientación (frente-contrafrente) de los distintos individuos experimentales al comenzar pruebas de preferencia o, alternar el lugar de ubicación de los estímulos. En experimentos de selección, ubicación espacial o preferencia, también deben mantenerse controladas las claves contextuales (e.g.: la sala de experimentación) ya que los anfibios adultos podrían orientarse por otras claves contextuales distintas a las que se quieren evaluar⁽⁷²⁾. Por ejemplo, si la sala experimental tiene paredes heterogéneas, se puede establecer un perímetro alrededor del recinto experimental con una cortina de tela o plástico de color uniforme.

En algunas situaciones experimentales se debe tener en cuenta si la variable comportamental a registrar depende de cierto estado motivacional y/o fisiológico de los sujetos experimentales. Por ejemplo, si se quiere evaluar qué región del cuerpo de un renacuajo es preferida para ataques directos de un insecto depredador se debería privar de alimento al depredador por algunas

horas (dependiendo de cada especie y tiempo de digestión) para asegurarse la motivación para atacar⁽⁷³⁾. También, si se quiere evaluar la conducta de ramoneo o alimentación de renacuajos en función de ciertos estímulos contextuales se debería privar de alimento a los renacuajos un tiempo previo a la evaluación para asegurar que están motivados para alimentarse⁽⁷⁴⁾.

En estudios de aprendizaje y conducta es muy importante el uso de animales “naïve” o sin experiencia previa con ciertos estímulos de interés. En el caso de renacuajos y estudios de aprendizaje relacionado a estímulos químicos naturales es muy importante lo que mencionáramos previamente sobre la colecta de embriones en estadio de gástrula. El uso de animales naïve es excluyente si se quiere investigar si un comportamiento es innato o puede ser modulado por aprendizaje⁽⁷⁵⁾. Asimismo, en la búsqueda de capacidades de aprendizaje, si no se trabaja con animales naïve no se podrán separar los efectos de mecanismos de aprendizaje previos (inhibición latente, habituación, sensibilización) de los resultados que se obtengan en el experimento⁽⁷⁶⁾. Una excepción es cuando se estudian capacidades de aprendizaje en contextos nuevos o con estímulos novedosos o artificiales, por ejemplo, el aprendizaje por discriminación de geometría en anuros adultos⁽⁷²⁾. Otras características de las larvas de anfibios a tener en cuenta particularmente en estudios de aprendizaje y dependiendo del tipo de estudio a desarrollar es el aprendizaje social. Por ejemplo, existe evidencia de transmisión social del reconocimiento de depredadores en larvas de anfibios, incluso en especies que no son gregarias^(77,78). En este sentido, cuando se evalúan respuestas conductuales y particularmente capacidades de aprendizaje individual con estímulos plausibles de aprendizaje social, es aconsejable realizar las evaluaciones con réplicas conformadas por un solo sujeto experimental.

Hay varias características de los estudios de comportamiento y de los de aprendizaje que hace que los grupos control en el diseño no sean como los típicos grupos control que hemos mencionado previamente (en el que sólo se altera el tratamiento en estudio). Asimismo, un resultado de mediciones de una conducta en función de un tratamiento dado tiene que poder asociarse exclusivamente con la pregunta experimental y no así con disturbios ambientales o la metodología experimental. Mencionaremos algunos ejemplos de controles experimentales específicos y algunos ejemplos de controles internos en el trabajo experimental. Por ejemplo, los grupos control en experimentos de aprendizaje se diseñan en base al mecanismo de aprendizaje que se quiera evaluar (e.g.: condicionamiento pavloviano, habituación-sensibilización, etc.) y están ampliamente explicados en la literatura; sin importar con qué especie animal o con qué estímulos se trabaje, esos grupos control deben estar presentes en el diseño experimental^(75,77,79). La alta variabilidad indivi-

dual en conductas como la locomoción en larvas de anfibios hace que sea muy útil incorporar comparaciones de locomoción interindividual para generar la variable respuesta final, por ejemplo, comparar la locomoción (tiempo, frecuencia, etc.) durante la exposición a un estímulo con la locomoción previo a la exposición a dicho estímulo^(61,75,79). En el estudio de la importancia de señales visuales o químicas en anuros adultos el uso de moldes o *dummys* es una forma de controlar ciertas características muy variables de los anuros vivos que, para reducirlas en el diseño, se requeriría de un número muy alto de réplicas. Por ejemplo, para evaluar el peso de claves visuales de machos (e.g.: saco vocal) en la elección de pareja por una hembra en un test de doble elección, Taylor y colaboradores^(62,81) construyeron un molde de anuro macho con saco vocal expansible y lo colocaron junto a un reproductor de vocalizaciones. Con el molde se controlaban otras variables asociadas a un individuo vivo (tamaño, color, motivación, etc.) y el control propiamente del experimento lo constituía otro reproductor localizado del lado contrario y sin molde de anuro macho junto a él^(62,81). En otro caso, para evaluar el rol de ciertas secreciones glandulares de machos en la elección de una hembra, Brunetti y colaboradores (resultados no publicados) construyeron moldes de anuros machos que colocaban junto a reproductores de vocalización y que bañaban con secreciones glandulares o con agua (grupo control). De esta forma el comportamiento de la hembra sólo podía tener como factor de cambio las secreciones y no alguna otra clave asociada a un macho adulto vivo.

Consideraciones cuando se estudian aspectos relativos al incremento de la radiación ultravioleta (RUV) y a enfermedades infecciosas

Desde los años '90 se ha comenzado a poner énfasis en estudios relativos al efecto del cambio climático, el incremento de la RUV y diferentes enfermedades emergentes que han demostrado afectar la biología y ecología de los anfibios, disminuyendo poblaciones e incluso ocasionando la desaparición de especies, particularmente, en ambientes naturales “prístinos” donde hay poco impacto humano.

Radiación Ultravioleta

Los estudios experimentales que buscan evaluar el efecto de la RUV sobre embriones o larvas de anfibios pueden ser desarrollados tanto en incubadoras o cámaras tipo “Walk-in”, o pueden realizarse en el exterior con incidencia de radiación solar natural. Es recomendable seguir algunas pautas indicadas en varios apartados que fueron desarrollados anteriormente, a saber:

- Minimizar la manipulación de los individuos
- Mantener la asepsia y cuidado de las condiciones del agua empleada durante el desarrollo experimental

En el caso del trabajo experimental en el laboratorio es recomendable:

- Limitar el tiempo de exposición del personal que manipula el set experimental bajo incidencia de RUV al mínimo necesario.
- Asegurar el empleo de gafas adecuadas por parte de todo el personal que participe en la manipulación de organismos bajo lámparas e incubadoras que emitan RUV

En cuanto a equipamiento, en el caso de estudios de RUV en laboratorio existen incubadoras acondicionadas con iluminación UV y PAR (con lámparas UV-A: radiación entre 315 y 400 nanómetros; UV-B: radiación entre 280 y 315 nanómetros; y espectro visible o radiación fotosintéticamente activa (PAR): radiación entre los 400 y los 700 nanómetros) (e.g. Incubadora Sanyo MLR-5®; **Figura 4.6.12A**). Pueden usarse lámparas especiales como lámparas fluorescentes del tipo Spectroline X-15-B (Spectronics Corp.®, y en el caso de lámparas con el espectro visible (PAR) por ejemplo, Philips daylight, TLT 40W/54RS® (**Figura 4.6.12B**)⁽⁸²⁾.

También, en caso de realizar experimentos de RUV con luz natural (radiación solar), es usual para bloquear RUV el empleo de placas de policarbonato que son testeadas con espectroradiómetro de manera de tener un control de la cantidad de luz que estas placas están filtrando y en función de la necesidad de filtrar mayor o menor intensidad de RUV (**Figura 4.5.12C**)⁽⁸²⁾.

Enfermedades Emergentes

El efecto deletéreo de estas enfermedades en el normal desarrollo del ciclo de vida de los anfibios, considerados centinelas de calidad ambiental o bioindicadores, puede estudiarse a través del trabajo experimental. Para ello es importante, además de tener presentes los protocolos para minimizar la exposición y transmisión de patógenos durante el muestreo (**Tabla 4.6.1**), seguir ciertos protocolos al momento del montado de este tipo de experimentos.

A continuación, explicamos nuestra experiencia con la manipulación y montado de experimentos para el estudio del Oomycetes sobre embriones de anfibios. Dicha experiencia corresponde a estudios en especies de mohos acuáticos presentes en ambientes del bosque ecotonal del norte patagónico como *Saprolegnia* sp., *Achlya* sp., *Scoliolegnia* sp. (Oomycetes). Las pautas y recomendaciones a seguir serán:

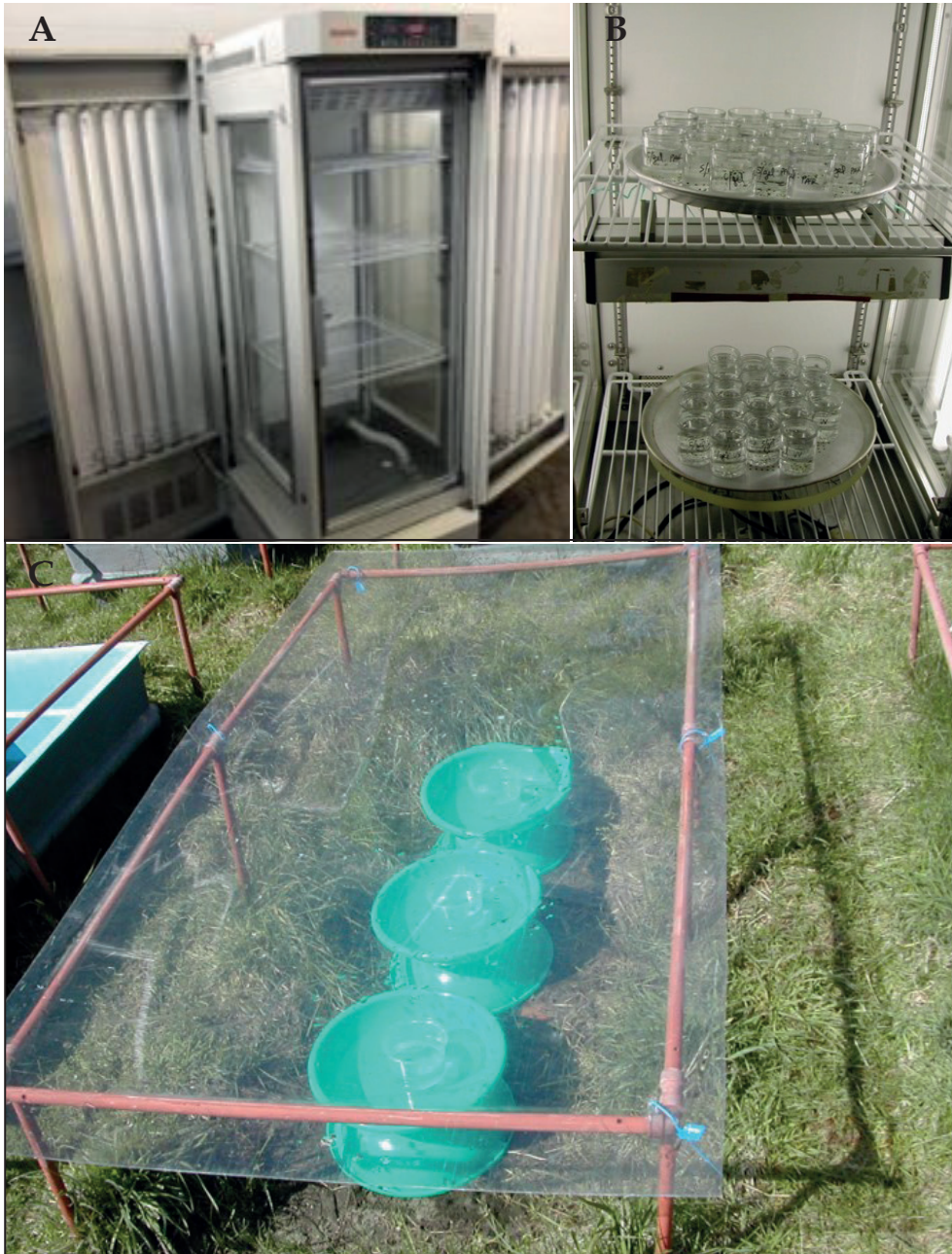


Figura 4.6.12. Experimentación con embriones y larvas de anfibios. **A.** Laboratorio, empleo de Incubadora *ad hoc* Sanyo MLR-5; **B.** Uso de lámparas UV-PAR en incubadora (Spectroline X-15-B); **C.** Exterior, uso de placas de policarbonato (empleada como filtro en experimentos de radiación ultravioleta con luz natural). Fotos: M. G. Perotti.

- Mantener asepsia en todos los recipientes a emplear en los ensayos experimentales; para ello y evitando la contaminación de hongos provenientes del campo, es aconsejable que los recipientes sean de vidrio, tratados en estufa y secados.
- Las oviposaduras y/o larvas colectadas a campo, deben ser lavadas en laboratorio, con la menor manipulación posible y previamente al montado del experimento según la siguiente metodología:

- El agua proveniente de los respectivos ambientes de colecta de los anfibios debe ser hervida por al menos 10 minutos para asegurar la mortalidad de esporas y micelio de potenciales mohos acuáticos. Posteriormente, el agua se deja enfriar para luego lavar mediante varios enjuagues los embriones y/o larvas de anfibios a emplear en el ensayo^(17,47).

Bibliografía

1. Underwood, A. 1991. The logic of ecological experiments: a case history from studies of the distribution of macro-algae on rocky intertidal shores. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 71: 841-866.
2. Underwood, A.J. 1997. *Experiments in Ecology: Their Logical Design and Interpretation Using Analysis of Variance*. Cambridge University Press, New York.
3. Cooke, S.J.; Birnie-Gauvin, K.; Lennox, R.J.; Taylor, J.J.; Rytwinski, T.; Rummer, J.L.; Franklin, C.E.; Bennett, J.R. & Haddaway, N.R. 2007. How experimental biology and ecology can support evidence-based decision-making in conservation: avoiding pitfalls and enabling application. *Conservation Physiology* 5: cox043.
4. Clobert, J.; Chanzy, A.; Le Galliard, J-F.; Chabbi, A.; Greiveldinger, L.; Caquet, T.; Loreau, M.; Mougin, C.; Pichot, C.; Roy, J. & Saint-André, L. 2018. How to integrate experimental research approaches in ecological and environmental studies: AnaEE France as an example. *Frontiers in Ecology and Evolution* 6: 43.
5. Dean, A.; Voss, D. & Dragulji, D. 2017. *Design and Analysis of Experiments*. Second Edition. Springer International Publishing AG.
6. Burggren, W.W. & Warburton, S. 2007. Amphibians as animal models for laboratory research in physiology. *ILAR Journal* 48: 260-269.
7. Heyer, W.R.; McDiarmid, R.W. & Weigmann, D.L. 1975. Tadpoles, predation and pond habitats in the tropics. *Biotropica* 7: 100-111.
8. Morin, P.J.; Lawler, S.P. & Johnson, E.A. 1990. Ecology and breeding phenology of larval *Hyla andersonii*: the disadvantages of breeding late. *Ecology* 71: 1590-1598.
9. Formanowicz Jr., D.R. 1986. Anuran tadpole/aquatic insect predator-prey interactions: tadpole size and predator capture success. *Herpetologica* 42: 367-373.
10. Wilbur, H.M. 1997. Experimental ecology of food webs: complex systems in temporary ponds. The Robert H. Mac-Arthur Award lecture. *Ecology* 78: 2279-2302.
11. Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Attademo, A.M.; Junges, C.M.; Teglia, C.M.; Martinuzzi, C.; Curi, L.; Culzoni, M.J. & Goicoechea, H.C. 2017. Ecotoxicity of veterinary enrofloxacin and ciprofloxacin antibiotics on anuran amphibian larvae. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 51: 114-123.
12. Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M.; Martinuzzi, C.S.; Attademo, A.M.; Bassó, A. & Colussi, C.L. 2019. Insecticide pyriproxyfen (Dragón®) damage biotransformation, thyroid hormones, heart rate, and swimming performance of *Odontophrynus americanus* tadpoles. *Chemosphere* 220: 714-722.
13. Ortubay, S.; Cussac, V.; Battini, M.; Barriga, J.; Aigo, J.; Alonso, M.; Macchi, P.; Reissig, M.; Yoshioka, J. & Fox, S. 2006. Is the decline of birds and amphibians in a steppe lake of northern Patagonia a consequence of limnological changes following fish introduction? *Aquatic Conservation Marine and Freshwater Ecosystems* 16: 93-105.
14. Blaustein, A.R.; Urbina, J.; Snyder, P.W.; Reynolds, E.; Dang, T.; Hoverman, J.T.; Han, B.; Olson, D.H.; Searle, C. & Hambalek, N.M. 2018. Effects of emerging infectious diseases on amphibians: a review of experimental studies. *Diversity* 10: 1-49.
15. Fox, S.; Greer, A.; Torres-Cervantes, R. & Collins, P. 2006. First case of ranavirus associated morbidity and mortality in natural populations of the South American frog *Atelognathus patagonicus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 72: 87-92.
16. Ghirardi, R.; Perotti, M.G.; Steciow, M.M.; Arellano, M.L. & Natale, G.S. 2010. Potential distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Argentina: implications in amphibian conservation. *Hydrobiologia* 659: 111-115.


17. Perotti, M.G.; Basanta, M.D.; Steciow, M.; Sandoval-Sierra, J. & Diéguez-Uribeondo, J. 2013. Early breeding protects anuran eggs from *Saprolegnia* infection. *Austral Ecology* 38: 672-679.
18. Carey, C. & Alexander, M.A. 2003. Climate change and amphibian declines: is there a link?. *Diversity and Distributions* 9: 111-121.
19. Beebee, T.J.C. & Griffiths, R. 2005. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? *Biological Conservation* 125: 271-285.
20. Hopkins, W.A. 2007. Amphibians as models for studying environmental change. *ILAR Journal* 48: 270-277.
21. Lips, K.R.; Diffendorfer, J.; Mendelson, J.R. & Sears, M.W. 2008. Riding the wave: reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *PLoS Biology* 6: e72.
22. Alton, L.A. & Franklin, C.E. 2017. Drivers of amphibian declines: effects of ultraviolet radiation and interactions with other environmental factors. *Climate Change Responses* 4: 6.
23. Perotti, M.G.; Bonino, M.F.; Ferraro, D. & Cruz, F.B. 2018. How sensitive are cold temperate tadpoles to climate change? The use of thermal physiology and niche model tools to assess vulnerability. *Zoology* 127: 95-105.
24. Hall, B.K. 1992. *Evolutionary Developmental Biology*. Chapman & Hall, London.
25. Fabrezi, M. 2011. Heterochrony in growth and development in anurans from the Chaco of South America. *Evolutionary Biology* 38: 390-411.
26. Fabrezi, M.; Quinzio S.I.; Goldberg, J.; Cruz, J.C.; Pereyra, M.C. & Wassersug, R.J. 2016. Developmental changes and novelties in ceratophryid frogs. *EvoDevo* 7:5.
27. Quinzio, S. & Fabrezi, M. 2012. Ontogenetic and structural variation of mineralizations and ossifications in the integument within Ceratophryid frogs (Anura, Ceratophryidae). *Anatomical Records* 295: 2089-2103.
28. Quinzio, S. & Fabrezi, M. 2014. The lateral line system in anuran tadpoles: neuromast morphology, arrangement, and innervation. *Anatomical Records* 297:1508-1522.
29. Abdala, V. & Ponssa, M.L. 2012. Life in the slow lane: the effect of reduced mobility on tadpole limb development. *Anatomical Records* 295: 5-17.
30. Underwood, A.J. 2009. Components of design in ecological field experiments. *Annales Zoologici Fennici* 46: 93-111.
31. Martin, P.R. & Bateson, P.P.G. 2007. *Measuring Behaviour: An Introductory Guide*. Third Edition. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
32. Stebbins, R.C. & Cohen, N.W. 1997. *A Natural History of Amphibians*. Princeton University Press. Princeton.
33. McDiarmid, W. & Altig, R. 2000. *Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae*. University of Chicago Press, Chicago, USA.
34. Boone, M.D. & James, S.M. 2005. Aquatic and terrestrial mesocosms in amphibian ecotoxicology. *Applied Herpetology* 2: 231-257.
35. Stewart, R.I.A.; Dossena, M.; Bohan, D.A.; Jeppesen, E.; Kordas, R.L.; Ledger, M.E.; Meerhoff, M.; Moss, B.; Mulder, C.; Shurin, J.B.; Suttle, B.; Thompson, R.; Trimmer, M. & Woodward, G. 2013. Mesocosm Experiments as a Tool for Ecological Climate-change Research: 71-181. *En. Woodward, G. & O'Gorman, E.J. (eds.). Advances in Ecological Research*. The Netherlands: Academic Press, Elsevier Ltd Elsevier, Amsterdam.
36. Forester, D.C. & Wisnieski, A. 1991. The significance of airborne olfactory cues to the recognition of home area by the dart-poison frog *Dendrobates pumilio*. *Journal of Herpetology* 25: 502-504.
37. Pfennig, K.S. 2000. Female spadefoot toads compromise on mate quality to ensure conspecific matings. *Behavioral Ecology* 11: 220-227.
38. Houck, L.D.; Palmer, C.A.; Watts, R.A.; Arnold, S.J.; Feldhoff, P.W. & Feldhoff, R.C. 2006. A new vertebrate courtship pheromone, PMF, affects female receptivity in a terrestrial salamander. *Animal Behaviour* 73: 315-320.
39. Chouinard, A.J. 2012. Rapid onset of mate quality assessment via chemical signals in a woodland salamander (*Plethodon cinereus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 66: 765-775.
40. Brunetti, A.E.; Taboada, C. & Faivovich, J. 2014. The reproductive biology of *Hypsiboas punctatus* (Anura: Hylidae): male territoriality and the possible role of different signals during female choice. *Salamandra* 50: 215-224.
41. Byrne, P.G. & Keogh, J.S. 2007. Terrestrial toadlets use chemosignals to recognize cons-

- pecifics, locate mates and strategically adjust calling behavior. *Animal Behaviour* 74: 1155-1162.
42. de Assis, V.R.; Navas, C.A.; Mendonça, M.T. & Gomes, F.R. 2012. Vocal and territorial behavior in the Smith frog (*Hypsiboas faber*): Relationships with plasma levels of corticosterone and testosterone. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular and Integrative Physiology* 163: 265-271.
 43. Rohr, J.R. & Palmer, B.D. 2005. Aquatic herbicide exposure increases salamander desiccation risk eight months later in a terrestrial environment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 1253-1258.
 44. Hopkins, W.A.; DuRant, S.E.; Staub, B.P.; Rowe, C.L. & Jackson, B.P. 2006. Reproduction, embryonic development, and maternal transfer of contaminants in the amphibian *Gastrophryne carolinensis*. *Environmental Health Perspective* 114: 661-666.
 45. Bredeweg, E.M.; Morzillo, A.T.; Thurman, L.L. & Garcia, T.S. 2019. The integrative effects of behavior and morphology on amphibian movement. *Ecology and Evolution* 9: 1278-1288.
 46. Phillott, A.D.; Speare, R.; Hines, H.B.; Skerratt, L.F.; Meyer, E.; McDonald, K.R.; Cashins, S.D.; Mendez, D. & Berger, L. 2010. Minimising exposure of amphibians to pathogens during field studies. *Diseases of Aquatic Organisms* 92: 175-185.
 47. Ruthig, G.R. 2009. Water molds of the genera *Saprolegnia* and *Leptolegnia* are pathogenic to the North American frogs *Rana catesbeiana* and *Pseudacris crucifer*, respectively. *Diseases of Aquatic Organisms* 84: 173-178.
 48. Betancourt, R.F.; Baffico, G. & Beamud, S.G. 2017. Alga didymo. Una pequeña gran invasora. *Desde la Patagonia Difundiendo Saberes* 14: 28-34.
 49. Ghirardi, R.; Lescano, J.N.; Longo, M.S.; Robledo, G.; Steciow, M. & Perotti, M.G. 2009. Chytridiomycosis in Argentina. First record in *Leptodactylus gracilis* and a new record in *Leptodactylus ocellatus*. *Herpetological Review* 40: 175-176.
 50. Bardier, C.; Ghirardi, R.; Levy, M. & Maneyro, R. 2011. First case of chytridiomycosis in an adult specimen of a native anuran from Uruguay. *Herpetological Review* 42: 65-66.
 51. Ghirardi, R.; Levy, M.G.; López, J.A.; Corbalán, V.; Steciow, M.M. & Perotti, M.G. 2014. Endangered amphibians infected with the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in austral temperate wetlands from Argentina. *The Herpetological Journal* 24: 129-133.
 52. Ghirardi, R.; Levy, M.G.; López, J.A.; Steciow, M.M. & Perotti, M.G. 2014. *Batrachochytrium dendrobatidis* infecting anurans in a protected area from Santa Fe province, Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 28: 29-31.
 53. Arellano, M.L.; Natale, G.S.; Grilli, P.G.; Barrasso, D.A.; Steciow M.M. & Lavilla, E.O. 2017. Hostpathogen relationships between the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* and tadpoles of five South American anuran species. *The Herpetological Journal* 27: 33-39.
 54. Albariño R.J. & Añón Suárez, D.A. 2020. Invasiones biológicas en Patagonia: efectos del alga didymo sobre los macrocrustáceos nativos del Río Limay, Parque Nacional Nahuel Huapi. *Macroscopeia* 10: 15-20.
 55. Hepper, P.G. & Waldman, B. 1992. Embryonic olfactory learning in frogs. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology Section B* 44: 179-197.
 56. Kiesecker, J. & Blaustein, A. 1997. Population differences in responses of Red-Legged Frogs (*Rana aurora*) to introduced Bullfrogs. *Ecology* 78: 1752-1760.
 57. Melotto, A.; Manenti, R. & Ficetola, G.F. 2020. Rapid adaptation to invasive predators overwhelms natural gradients of intraspecific variation. *Nature Communications* 11: 3608.
 58. Warkentin, K.M. 2011. Plasticity of hatching in amphibians: evolution, trade-offs, cues and mechanisms. *Integrative and Comparative Biology* 51: 111-127.
 59. Jara, F.G.; Cuello M.E. & Úbeda, C. 2019. Afrontando el invierno: la rana de ceja corta se reproduce y desarrolla en condiciones climáticas adversas. *Macroscopeia* 8: 16-21.
 60. Van Buskirk, J. 2012. <https://www.ieu.uzh.ch/en/research/ecology/change/labprotocols.html>
 61. Pueta, M.; Andaluz Arcos, N. & Perotti, M.G. 2017. El estado de alimentación de renacuajos de *Pleurodema thaul* (Anura: Leptodactylidae) modula la adquisición de un aprendizaje relacionado a riesgo de depredación. *Cuadernos de Herpetología* 31: 83-91.
 62. Taylor, R.C.; Buchanan, B.W. & Doherty, J.L. 2007. Sexual selection in the squirrel treefrog *Hyla squirella*: the role of multimodal cue assessment in female choice. *Animal Behaviour* 74: 1753-1763.

63. Petersen, J.; Cornwell, J. & Kemp, W. 1999. Implicit scaling in the design of experimental aquatic ecosystems. *Oikos* 85: 3-18.
64. Espinoza, R.E. & Quinteros, S. 2008. A hot knot of toads: Aggregation provides thermal benefits to metamorphic Andean toads. *Journal of Thermal Biology* 33: 67-75.
65. Ferrari, M.C.O.; Messier, F. & Chivers, D.P. 2008. Degradation of chemical alarm cues under natural conditions: risk assessment by larval woodfrogs. *Chemoecology* 17: 263-266.
66. Fordham, D.A. 2015. Mesocosms reveal ecological surprises from climate change. *PLoS Biology* 13: e1002323.
67. Hurlbert, S.H. 1984. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological Monographs* 54: 187-211.
68. Bonino, M.F.; Cruz, F.B. & Perotti, M.G. 2020. Does temperature at local scale explain thermal biology patterns of temperate tadpoles? *Journal of Thermal Biology* 94: 102744.
69. Yamashita, M.; Naitoh, T. & Wassersug, R. 2000. Startle response and turning bias in *Micrrohyla* tadpoles. *Zoological Science* 17: 185-189.
70. Robins, A. 2005. Lateralized visual processing in anurans: New vistas through ancient eyes. *Bioscience* 1: 462-473.
71. Lucon-Xiccato, T.; Chivers, D.P.; Mitchell, M.D. & Ferrari, M.C.O. 2017. Prenatal exposure to predation affects predator recognition learning via lateralization plasticity. *Behavioral Ecology* 28: 253-259.
72. Sotelo, M.I.; Bingman, V.P. & Muzio, R.N. 2015. Goal orientation by geometric and feature cues: spatial learning in the terrestrial toad *Rhinella arenarum*. *Animal Cognition* 18: 315-323.
73. Perotti, M.G.; Pueta, M.; Jara, F.G.; Ubeda, C.A. & Moreno Azocar, D.L. 2016. Lack of functional link in the tadpole morphology induced by predators. *Current Zoology* 62: 227-235.
74. Pueta, M.; Cruz, F.B. & Perotti, M.G. 2016. Feeding regime and food availability determine behavioural decisions under predation risk in *Pleurodema thaul* (Anura: Leiuperidae) tadpoles. *The Herpetological Journal* 26: 61-64.
75. Pueta, M. & Perotti, M.G. 2016. Anuran tadpoles learn to recognize injury cues from members of the same prey guild. *Animal Cognition* 19: 745-751.
76. Domjan, M. 2003. Principios de Aprendizaje y Conducta. Thomson, Madrid.
77. Ferrari, M.C.O.; Messier, F. & Chivers, D.P. 2007. First documentation of cultural transmission of predator recognition by larval amphibians. *Ethology* 113: 621-627.
78. Crane, A.L.; Mathis, A. & McGrane C. 2012. Socially facilitated antipredator behavior by ringed salamanders (*Ambystoma annulatum*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 66: 811-817.
79. Rankin, C.H.; Abrams, T.; Barry, R.J.; Bhatnagar, S.; Clayton, D.F.; Colombo, J.; Coppola, G.; Geyer, M.A.; Glanzman, D.L.; Marsland, S.; McSweeney, F.K.; Wilson, D.A.; Chun-Fang Wu, C-F. & Thompson, R.F. 2009. Habituation revisited: an updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiology of Learning and Memory* 92: 135-138.
80. Ferrari, M.C.O.; Brown, G.E.; Messier, F. & Chivers, D.P. 2009. Threat-sensitive generalization of predator recognition by larval amphibians. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 63: 1369-1375.
81. Taylor, R.C.; Klein, B.A.; Stein, J. & Ryan, M.J. 2011. Multimodal signal variation in space and time: how important is matching a signal with its signaler? *The Journal of Experimental Biology* 214: 815-820.
82. Perotti, M.G. & Diéguez, M.C. 2006. Effect of UV-B exposure on eggs and embryos of the Patagonian frog *Pleurodema bufoninum* and evidence of photoprotection. *Chemosphere* 65: 2063-2070.
83. Basanta, M.D. 2011. Determinación, grado de infección y rol ecológico de hongos acuáticos (Oomycetes) en dos poblaciones de *Pleurodema thaul* (Anura, Leiuperidae). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional del Comahue.
84. Cuello, M.E.; Ubeda, C. & Perotti, M.G. 2005. La rana acuática de Laguna Blanca. *Revista de la Fundación Vida Silvestre Argentina* 93: 21-25.

Apéndice 4.6.1

2010 - "Año del Centenario de la Revolución de Mayo"



000774

Ministerio de Turismo
Administración de Parques Nacionales
Ley N° 22.351

SAN CARLOS DE BARILOCHE, 16 NOV 2010

VISTO, la peligrosidad que las enfermedades "Quitridiomycosis" y "Ranavirosis" representan para las poblaciones de anfibios según consta en el informe que cursa por TIN° 5634/10, y

CONSIDERANDO:

QUE, en el Parque Nacional Nahuel Huapi aún no se ha detectado la mencionada enfermedad, ni tampoco casos de afecciones provocadas por otros agentes patógenos en las poblaciones de anfibios.

QUE, en el Parque Nacional Nahuel Huapi es reservorio de las únicas poblaciones del anfibio microendémico *Atelognathus nitoi* (rana del Challhuaco) y de otros endemismos regionales.

QUE, la ocurrencia de estas enfermedades pondrían en serio riesgo de extinción a las poblaciones de rana del challhuaco y de las demás especies de anfibios.

QUE, en el Parque Nacional Nahuel Huapi existen los recursos humanos y operativos para garantizar la implementación de medidas tendientes a los cuidados necesarios para evitar que la "Quitridiomycosis" y la "Ranavirosis" ingresen y contagien a las mencionadas poblaciones.

QUE la medida que se adopta halla su sustento legal en las facultades conferidas por Decreto N° 1375/96.

Por ello,

EL INTENDENTE DEL PARQUE NACIONAL NAHUEL HUAPI

DISPONE:

ARTICULO 1°.- APROBAR la implementación del protocolo "Como desinfectar el material de campo cuando se trabaja en humedales" el cual se adjunta como parte integrante de la misma.



Ministerio de Turismo
Administración de Parques Nacionales
Ley N° 22.351

2010 - "Año del Bicentenario de la Revolución de Mayo"

000774

Informe: Quitridiomycosis

Es una enfermedad exclusiva de los anfibios y es causada por el hongo quitridio (*Batrachochytrium dendrobatidis*). Afecta a la piel de sapos y ranas tanto en su etapa de renacuajo como de adulto. Produce lesiones graves en toda la superficie del cuerpo complicándose el cuadro de la enfermedad por la colonización de bacterias, todo lo cual altera la función de la piel como barrera contra toxinas y agentes de infección, en la respiración y en la circulación y mantenimiento del agua de los electrolitos. Los síntomas son aletargamiento, inapetencia y adelgazamiento, seguido por la muerte del individuo.

Esta enfermedad significa un serio riesgo para las poblaciones de anfibios, existiendo numerosos casos de extinciones locales causadas por ella, incluso en Argentina.

El hongo vive en el agua y puede ser transportado accidentalmente en equipos utilizados en cuerpos de agua.

El PNNH es reservorio de las únicas poblaciones del mundo del microendemismo *Atelognathus nitoi* (rana del chullhuaco) y de poblaciones de endemismos regionales, por ello las acciones para la conservación de la rana del Chullhuaco y de los anfibios en general es prioritaria y en este sentido se sugieren las siguientes

recomendaciones:

1. Evitar el intercambio de equipos para el combate de incendios a otras áreas, especialmente al Parque Nacional Laguna Blanca.
2. Aplicar obligatoriamente el protocolo "Como desinfectar el material de campo cuando se trabaja en humedales" (Sperare et al. 2004. Hygiene protocol for handling amphibians in field studies), el cual se adjunta como anexo del presente.

Estas recomendaciones fueron sugeridas, y a nuestra solicitud por la Dra. M. Gabriela Perotti de Fotobiología (UN del Comahue-INIBIOMA-CONICET) y la Dra. Romina Ghirardi del Instituto Nacional de Limnología (INALI-CONICET-UN del Litoral).

Susan Seijas
Div. Manejo de Recursos
Tº N° 5634/10



Ministerio de Turismo
Administración de Parques Nacionales
Ley N° 22.351

2010 - "Año del Bicentenario de la Revolución de Mayo"

000774

COMO DESINFECTAR EL MATERIAL DE CAMPO CUANDO SE TRABAJA EN HUMEDALES
Protocolo según Speare et al. 2001

Propósito	Desinfectante	Concentración	Tiempo
Desinfección de equipo para combate de incendios y de calzado.	Lavandina doméstica (hipoclorito de sodio)	4%	15 minutos
Desinfección de ropa o telas	Agua caliente	60°C o más	15 minutos